

**BULB OF EYE PRESERVING SOLUTION FOR CORNEA GRAFT****Publication number:** JP6107538**Publication date:** 1994-04-19**Inventor:** OBARA TAKEO; YAMAGUCHI TOSHIJIRO**Applicant:** SHISEIDO CO LTD**Classification:**

- International: **A01N1/02; A61F9/00; A61K9/08; A61F9/00; A01N1/02; A61F9/00; A61K9/08; A61F9/00; (IPC1-7): A61F9/00; A61K9/08; A01N1/02**

- European:

**Application number:** JP19920104009 19920331**Priority number(s):** JP19920104009 19920331**Report a data error here****Abstract of JP6107538**

**PURPOSE:**To obtain a bulb of eye preserving solution for cornea graft comprising hyaluronic acid, one polymer substance of organism, having high viscoelasticity and extremely high water retention, capable of reducing swelling properties of cornea during storage or its physiologically permissible salt.

**CONSTITUTION:**A bulb of eye preserving solution for cornea graft comprises hyaluronic acid or its physiologically permissible salt (especially preferably one having 50,000-250,000 molecular weight). The amount of hyaluronic acid or its physiologically permissible salt is preferably 0.05-0.5wt/vol.% per preserving solution. The osmotic pressure of the bulb of eye preserving solution for cornea graft is preferably adjusted to 260-350 mOsm. An extracted whole bulb of eye or corneal piece is stored in the preserving solution. The preserving solution has low swelling properties of cornea, has low influence on corneal endothelia cell and is excellent.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-107538

(43) 公開日 平成6年(1994)4月19日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 9/08	E	7329-4C		
	V	7329-4C		
A 0 1 N 1/02		9159-4H		
// A 6 1 F 9/00	3 2 2	8119-4C		

審査請求 未請求 請求項の数4(全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平4-104009  
(22) 出願日 平成4年(1992)3月31日

(71) 出願人 000001959  
株式会社資生堂  
東京都中央区銀座7丁目5番5号  
(72) 発明者 小原 健男  
神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株式会社資生堂研究所内  
(72) 発明者 山口 敏二郎  
神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株式会社資生堂研究所内  
(74) 代理人 弁理士 青木 朗 (外4名)

(54) 【発明の名称】 角膜移植用眼球保存液

(57) 【要約】

【構成】 分子量が5万～250万であるヒアルロン酸またはその生理学的に許容される塩0.05～0.5重量/容量%を含んでなる角膜移植用眼球保存液。

【効果】 角膜移植用眼球保存液にヒアルロン酸またはその生理学的に許容される塩を含めることにより、保存中の角膜膨潤性を低減できる。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒアルロン酸またはその生理学的に許容される塩を含んでなる角膜移植用眼球保存液。

【請求項2】 ヒアルロン酸の分子量が5万～250万であり、その濃度が前記保存液当たり0.05～0.5重量／容量％である請求項1記載の角膜移植用眼球保存液。

【請求項3】 浸透圧が260～350mOsmに調整された請求項1または2記載の角膜移植用眼球保存液。

【請求項4】 摘出全眼球または強角膜片の保存に使用できる請求項1～3のいずれかに記載の角膜移植用眼球保存液。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、角膜移植用眼球保存液に関し、特にヒアルロン酸またはその生理学的に許容される塩を含んでなる角膜移植用眼球保存液に関する。

【0002】

【従来の技術】 角膜移植に用いられる全眼球や強角膜片は人体から摘出後速やかに低温保存されることが望ましく、保存に際しては角膜内皮細胞に影響を与えず、角膜の膨潤を招かないことが要求される。しかしながら、単に低温保存しても角膜内皮のイオンポンプはいまだ4％程度働いており、長期間保存するとポンプ機能は減弱し、強いては角膜の膨化ならびに角膜内皮細胞の破壊を引き起こす。そこで、全眼球あるいは強角膜片を低温で長期間保存するための保存液（眼球保存液）の開発が切望され、種々研究が進められてきたが、良好な保存液は得られていなかった。

【0003】 ところが、Diksteinらは $\text{HCO}_3^-$ イオンを含まないメEDIUM中で強角膜片をインキュベーションすると角膜内皮の $\text{HCO}_3^-$ ポンプが止まり、角膜はゆっくり膨潤してゆくが、再び $\text{HCO}_3^-$ を含有した液に換えると $\text{HCO}_3^-$ ポンプが働き膨潤が回復する事実を見出した（S.Diksteinら：J.Physiol., 221, 29～41, 1972）。そのため、低温保存と $\text{HCO}_3^-$ イオンフリーによるポンプの休眠化保存を組み合わせることにより、角膜片の寿命を一層延長させることが可能となった。このような観点から、GPR（Glucose-Phosphate-Ringer）等の眼球保存液が開発された。さらに、角膜の膨化を抑制する目的で多糖類であるデキストランを添加した眼球保存液（EP-II液等）が考案され、現在広く使用されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 前述したように、現在角膜移植用眼球保存液としては、 $\text{NaHCO}_3$ を含まない塩類溶液に多糖類であるデキストランを添加したものが広く使用されている。しかし、この眼球保存液の処方に含まれる高分子化合物であるデキストランは、血漿増量剤としてすでに使用されているとはいえ、元来生

2

体外成分であり、アレルギー反応を惹起する可能性のあることが指摘されている（A.W.Richterら：Immunol.Today, 3, 132～138, 1982）。また、デキストランは保存中の角膜の膨潤性を阻止するには有効であるが、保存期間が長くなるにつれて角膜内皮細胞等の角膜組織中の細胞に取り込まれ、その後角膜を前房水や無機塩類溶液中に置くと取り込まれたデキストランにより水分が角膜組織内に取り込まれ、角膜の膨潤を生じることが明らかになっている（D.S.Hullら：Invest.Ophthalmol., 15, 663～666, 1976、B.E.MacCareyら：Invest.Ophthalmol., 13, 165～173頁, 1974）。さらに、デキストランには、角膜内皮の保存状態を高める性質はなく、むしろ角膜内皮とデスメ膜の接着を弱めたり、角膜内皮細胞の機能を低下させる等有害な影響を与える可能性のあることも示唆されている（R.H.Lindstromら：Br.J.Ophthalmol., 70, 47～54, 1986、E.Pelsら：Cornea, 3, 219～227, 1984/1985）。

【0005】 デキストランを用いることによって生じるこのような危惧を無くすために、デキストランの代わりに生体内成分の一つであり、デキストランより良好なコロイド形成能（こう質浸透圧）を有するコンドロイチン硫酸ナトリウムを添加した眼球保存液が考案された（特開昭62-198601号公報）。しかしながら、平均分子量4万のコンドロイチン硫酸ナトリウムが2.5％添加されてなる眼球保存液（EP-III液）は、3.5％デキストランを含有する眼球保存液（EP-II液）と比較すると保存中の角膜膨潤性は少なく、優れた眼球保存液である可能性があると考えられたものの、さらに検討の余地があった（桑山信也他：眼紀、第41巻、第1691～1696, 1990）。さらに、高分子量のコンドロイチン硫酸ナトリウムではみられないが、低分子量のコンドロイチン硫酸ナトリウムでは、保存期間が長くなるにつれてデキストランと同様にそれらが角膜の各細胞に取り込まれ、移植後に角膜の顕著な膨潤を引き起こすことが報告されている（H.E.Kaufmanら：Am.J.Ophthalmol., 100, 299～304, 1985）ことから、分子量1万以下の低分子量コンドロイチン硫酸ナトリウムを除去する必要性も生じていた。このように、眼球保存液の改良は幾多行われてきたが、十分に満足できるものは得られていなかった。

【0006】 したがって、本発明の目的は、従来使用されてきた角膜移植用眼球保存液に付随する欠点の改良された当該保存液、例えば保存中の角膜膨潤性が低く、かつ角膜内皮細胞に対する影響の少ない優れた角膜移植用の眼球保存液を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記デキストランやコンドロイチン硫酸ナトリウムに代替でき、かつそれらの使用に付随する欠点を改良できる各種生体

高分子物質について検討した結果、主として高い粘弾性を有し、そして非常に高い保水性を持つことから眼科手術時に眼内に注入して用いられるヒアルロン酸を一定濃度で使用すると、意外にも保存中の角膜膨潤性を低減でき、上記課題が解決できることを見出し本発明を完成した。すなわち、本発明によれば、ヒアルロン酸またはその生理学的に許容される塩を含んでなる角膜移植用眼球保存液が提供される。

【0008】本発明で使用されるヒアルロン酸は、遊離酸でもその生理学的に許容される塩の形であってもよい。また、高純度で、混在する蛋白質やエンドトキシン等の不純物質により細胞障害性を示さず、医療用として支障をきたさないものであれば広く使用可能であり、その由来も特に限定されない。具体的には、臍帯、硝子体、鶏冠、微生物等から得られたヒアルロン酸が使用可能である。なお、生理学的に許容される塩とは、造塩されたヒアルロン酸が上述のような細胞障害性を示さないことをいう。そのため、かかる塩の種類は、本発明の目的に使用できるものである限り制限されないが、特に、本発明の保存液に添付される他の成分との適合性を有するナトリウム塩またはカリウム塩の形にあるものが好ましい。

【0009】かかるヒアルロン酸またはその生理学的に許容される塩としては、分子量が5万～250万の範囲内にあるものが使用でき、保存液当りのその濃度は、0.05～0.5重量/容量%の範囲内に調整して用いるのが好ましい。すなわち、本発明において、ヒアルロン酸またはその生理学的に許容される塩の分子量は5万以上であり、好ましくは60万以上である。分子量が5万未満であると、デキストランやコンドロイチン硫酸ナトリウムのように角膜の各組織に取り込まれ、角膜の膨潤が惹起され得る。また、分子量60万未満の場合も、ヒアルロン酸のような高分子物質の場合、その分子量分布が多分散性であることから、低分子量のヒアルロン酸が混在する可能性が高く、角膜移植後の良好な経過が望めない。

【0010】角膜移植用眼球保存液中のヒアルロン酸またはその塩の濃度は0.05～0.5重量/容量%であり、0.05%未満では、角膜膨潤抑制効果が十分でなく、良好な保存状態は得られない（後記試験例1参照）。また、濃度が0.5重量/容量%より高くなると、保存液の粘度が著しく増加してべとつき、眼球取り扱い時の操作性が悪くなる。

【0011】また、本発明の角膜移植用眼球保存液は、必要に応じて浸透圧、pH等を調製する他の成分が加えられる。用いられる他の成分としては、通常、陽イオンとしてナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオンおよびマグネシウムイオン等が、また陰イオンとして塩素イオン、リン酸イオン、硫酸イオンおよびクエン酸イオン等があげられ、さらにグルコースを含めること

ができる。

【0012】上記したような各成分を適当な濃度で処方して、そのpHを6.5～7.8に、浸透圧を260～350mOsmの範囲に調整すると、本発明の角膜移植用眼球保存液が提供される。なお、各成分は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、リン酸二ナトリウムとして添加されるのが好ましい。

【0013】本発明の角膜移植用眼球保存液の製造方法としては、例えば、まずNaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O及びMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>Oを室温で注射用水に溶解せしめ、次にグルコース、クエン酸ナトリウム二水塩、ヒアルロン酸ナトリウム、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>Oをそれぞれ溶解させた後合わせ、最後に滅菌する。また、必要に応じてフェノールレッド等の指示薬を滅菌前に添加することができる。かくして得られる保存液は、通常pHが6.5～7.8、浸透圧が260～350mOsmである。なお、当該保存液を使用直前に現場で調製できるように各成分をそれぞれ別個に包装した一連の試薬（成分）の組み合わせ物として提供することもできる。

【0014】

【実施例】次に、本発明を具体的な処方例、試験例、実施例に沿ってさらに詳細に説明するが、本発明はそれらの処方例、実施例のみに限定されるものではない。

#### 処方例1

2Lフラスコ中にNaCl 5.39g、KCl 0.41g、CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O 0.172gおよびMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.218gをとり、注射用水を加えて、室温で攪拌し溶解させた。次に、グルコース0.782gを加えて溶かし、さらにクエン酸ナトリウム二水塩0.9g、微生物起原の精製したヒアルロン酸ナトリウム（分子量180万）0.5g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25gおよびNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O 3.6gをその順でそれぞれ添加し溶解させ、全量を1Lとした。このものを濾過滅菌した後、100～500ml容のアンプルまたはバイアル瓶に分注し封入した。このもののpHは7.34であり、浸透圧は275mOsmであった。

#### 処方例2

2Lフラスコ中にNaCl 5.39g、KCl 0.41g、CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O 0.172gおよびMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.218gをとり、注射用水を加えて、室温で攪拌し溶解させた。次に、グルコース0.782gを加えて溶かし、さらにクエン酸ナトリウム二水塩0.9g、微生物起原の精製したヒアルロン酸ナトリウム（分子量200万）5.0g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25gおよびNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O 3.6gをその順でそれぞれ添加し溶解させ、全量を1Lとした。このものを濾過滅菌した後、100～500

ml容のアンブルまたはバイアル瓶に分注し封入した。このもののpHは7.20であり、浸透圧は280mOsmであった。

### 処方例3

2Lフラスコ中にNaCl 7.8g、KCl 0.41g、CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O 0.172gおよびMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.218gをとり、注射用水を加えて、室温で攪拌し溶解させた。次に、グルコース0.782gを加えて溶かし、さらにクエン酸ナトリウム二水塩0.9g、鶏冠起原の精製したヒアルロン酸ナトリウム(分子量80万)1.0g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25gおよびNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O 3.6gをその順でそれぞれ添加し溶解させ、全量を1Lとした。このもののpHは7.21であり、浸透圧は314mOsmであった。

【0015】本発明の眼球保存液の有用性を調べるために、処方例1で得られたもの、処方例1においてヒアルロン酸ナトリウムの濃度を0.01%にせしめたものおよびコンドロイチン硫酸ナトリウムを含有する松山らの角膜移植用眼球保存液(特開昭62-198601号公報参照)に準じた処方とを用いて全眼球保存効果を試験した。

### 試験例1

日本白色種雄性家兎(体重2~3kg)の全眼球を摘出した後、ヒアルロン酸ナトリウムを含有する処方例1、処方例1においてヒアルロン酸ナトリウムの濃度を0.01%にせしめたもの、あるいはヒアルロン酸ナトリウムに代えコンドロイチン硫酸ナトリウムを2.5%含有する角膜移植用眼球保存液に浸漬し、4℃にて保存した。眼球保存液は24時間毎に新しいものと入れ換えた。全眼球摘出後および眼球保存液に入れた後24時間毎にシルコ社製バキメーターにて角膜中央部の厚みを測定した。なお、本試験は各保存液について7眼ずつ実施した。

【0016】全眼球を7日間保存した時の角膜厚の測定結果をグラフに示すと図1のごとくである。図1において、黒丸はヒアルロン酸ナトリウムを0.05%含有する処方例1を、黒三角は処方例1においてヒアルロン酸ナトリウムの濃度を0.01%にせしめたものを、白丸はコンドロイチン硫酸ナトリウムを2.5%含有する角膜移植用眼球保存液を示すものである。ヒアルロン酸ナトリウムを0.05%含有する処方例1では、コンドロイチン硫酸ナトリウムを2.5%含有する角膜移植用眼球保存液と比較して、全眼球保存後2日以降において角膜厚の増加率は顕著に抑制されていた。一方、処方例1においてヒアルロン酸ナトリウムの濃度を0.01%にせしめたものでは、コンドロイチン硫酸ナトリウムを含有する角膜移植用眼球保存液と比較して角膜厚の増加率に差は認められなかった。

### 試験例2

この試験では、角膜内皮細胞に及ぼす影響を、デキストランを含有する眼球保存液であるEP-II液とヒアルロン酸ナトリウムを0.5%含有する処方例1とで比較した。

【0017】日本白色種雄性家兎(体重2~3kg)より得た強角膜片をEP-II液あるいは処方例1においてヒアルロン酸ナトリウムの濃度を0.5%にせしめたものに4℃にて9日間保存した。保存後直ちに、あるいは室温に1時間放置した後、強角膜片を、25mM NaHCO<sub>3</sub>を含有する保存液中に移し換え、37℃で1時間インキュベーションした(temperature reversalを実施)。インキュベーション後、2.5%グルタルアルデヒドにて強角膜片を固定し、常法に従って角膜内皮細胞を走査型電子顕微鏡観察に供した。

【0018】図2に正常の角膜内皮細胞の走査型電子顕微鏡写真を示す。細胞のモザイク模様のはっきりと見られ、また角膜内皮細胞表面の微細構造、すなわち微細突起は明瞭に観察される。図3~図6に試験例2の走査型電子顕微鏡写真を示す。図3及び図4から分かるように、保存後直ちにtemperature reversalを実施した強角膜片では、EP-II液および処方例1においてヒアルロン酸ナトリウムの濃度を0.5%にせしめたものにおいて、角膜内皮細胞はいずれも異常がなく良好に保存されていた。しかしながら、4℃にて保存後、室温に1時間放置した強角膜片においては、図5から分かるようにEP-II液の場合、角膜内皮細胞表面の微細突起に変形ないしは萎縮が生じていた。一方、処方例1においてヒアルロン酸ナトリウムの濃度を0.5%にせしめたものにおいては図6から分かるように、微細突起に変形ないしは萎縮は認められず、良好にその形態は保存されていた。

【0019】以上の試験結果から明らかなように生体成分の一つであり、かつヒト房水中の構成成分であるヒアルロン酸ナトリウムを含んでなる本発明の角膜移植用眼球保存液は、デキストランやコンドロイチン硫酸ナトリウムを含んでなる眼球保存液と同等もしくはそれ以上の優れた角膜保存効果を有するものであった。なお、角膜移植手術時においては、temperature reversalは、意図的に実施されることはなく、移植操作終了後に角膜受領者の前房水と移植された角膜が接することにより行われている。すなわち、日常の臨床現場においては、temperature reversalが実施される前に移植用の角膜はしばらくの間HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>イオンフリーの環境で室温にさらされる可能性があるのである。かかる事項を勘案した場合においても、ヒアルロン酸ナトリウムを含有した角膜移植用眼球保存液は、その角膜内皮細胞保存効果から分かるように極めて優れている。

### イン・ビボ(in vivo)試験

カニクイザル2頭より全眼球を摘出し、ヒアルロン酸ナトリウム0.1%を含有する処方例3に4℃で浸漬し

7

た。24時間浸漬後、別のカニクイザル4頭の片眼に対して浸漬後の角膜を移植した。すなわち、全眼球の前房に眼科手術補助剤（ヒーロン：登録商標）〔カビ フェルマシア社〕を少量注入した後、直径7mmのトレパンにて角膜を打ちぬき、角膜剪刀にて切り取った。角膜を受領するサルを塩酸ケタミン（ケタラール50：登録商標）〔三共〕45mg/kgおよびキシラジン塩酸塩（セラクター：登録商標）〔バイエル〕1.8mg/kgの筋肉内注射により麻酔した。片眼の角膜を直径7mmのトレパンにて打ち抜き、そこへ移植用角膜を載せた。10-0 ナイロン糸にて16針の端端縫合を行った後、生理食塩液を前房内に注入して、前房を形成した。術後、0.3%ゲンタマイシン（ゲンタシン：登録商標）〔エッセクス日本〕を1日5回点眼した。手術時の眼球の取り扱いや操作性は良好で、術後7日でのスリットランプによる検査では、角膜の混濁や前房中の炎症反応は見られなかった。さらに、6カ月まで観察したが、角膜の厚さは正常で、スベキュラーマイクロスコープによる観察結果においても、角膜内皮細胞の減少率は平均値で6.3%と低率であった。

【0020】

【発明の効果】本発明によれば、保存中の角膜膨潤性が低く、かつ角膜内皮細胞に対する影響の少ない優れた角膜移植用の眼球保存液が提供される。かかる効果は、ヒアルロン酸またはその生理学的に許容される塩を該保存液に含めることにより達成され、こうして従来より使用

8

されているデキストランまたはコンドロイチン硫酸ナトリウムが添加された角膜移植用眼球保存液と同等もしくはそれ以上の角膜保存効果を奏する眼球保存液が提供可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】試験例1における家兎全眼球の角膜厚の変化を示した特性グラフである。

【図2】生体から摘出直後の強角膜片の角膜内皮細胞（正常）の拡大図に代わる走査型電子顕微鏡写真である。

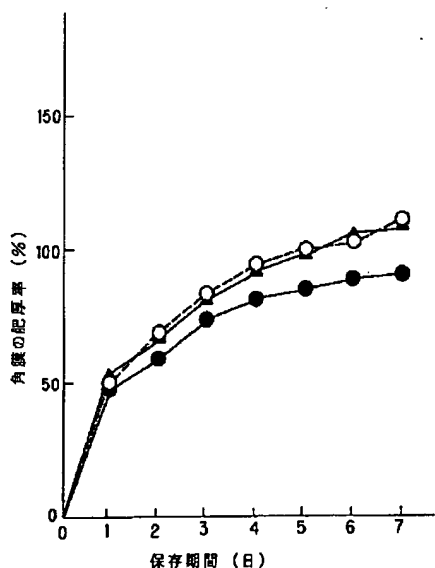
【図3】生体から摘出後、EP-II液に保存後直ちにtemperature reversalを実施した上記細胞の拡大図に代わる走査型電子顕微鏡写真である。

【図4】図3のEP-II液に代え処方例1の保存液を用いて図3のものと同様に処理した場合の上記細胞の拡大図に代わる走査型電子顕微鏡写真である。

【図5】生体から摘出後、EP-II液に保存後、さらに室温で1時間放置した後にtemperature reversalを実施した上記細胞の拡大図に代わる走査型電子顕微鏡写真である。

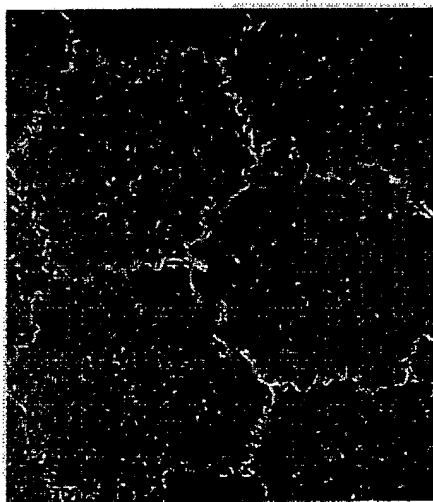
【図6】図5のEP-II液に代え処方例1の保存液を用いて図5のものと同様に処理した場合の上記細胞の拡大図に代わる走査型電子顕微鏡写真である。（なお、図2～6の顕微鏡写真は、いずれも倍率4000倍である。）

【図1】



【図4】

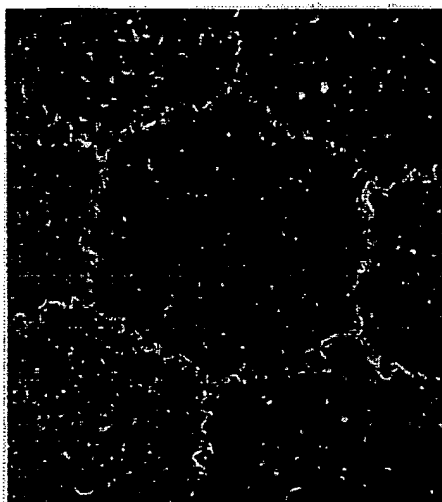
図4代用写真1  
処方例1



写真

【図2】

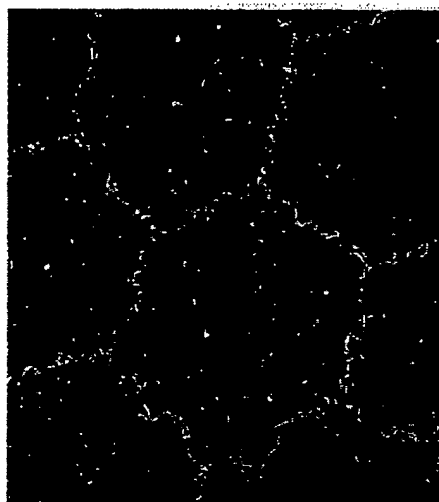
図面代用写真  
正常



写真

【図3】

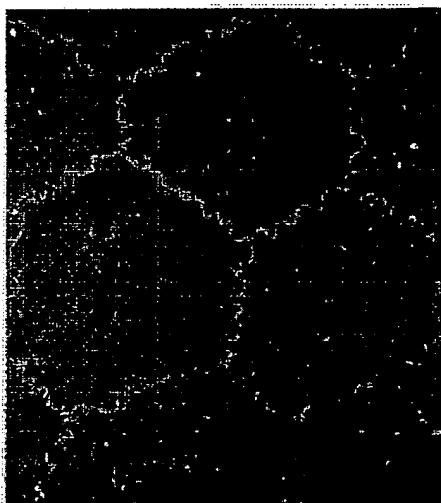
図面代用写真  
EP-I



写真

【図5】

図面代用写真  
EP-I



写真

【図6】

図面代用写真  
処方例1



写真